

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
10. Jg. 1972, S. 254—259

## Vergleich der Spezifität einfacher Methoden zur Bestimmung von Plasmacortisol

### 2. Mitteilung: Die Proteinbindungsmethode

Von K. M. PIRKE und D. STAMM

*Aus der Abteilung für Klinische Chemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, München*

(Eingegangen am 17. Januar 1972)

Es wurde die Proteinbindungsmethode nach MURPHY untersucht. Der Einfluß des zur Trennung von gebundenem und freiem Cortisol eingesetzten Adsorbens auf die Empfindlichkeit der Methode wurde systematisch analysiert. Die Zuverlässigkeitskriterien der Methode wurden ermittelt. Zur Prüfung der Spezifität analysierten wir die Plasmaproben von 50 Blutspendern. Die gleichen Proben wurden mit einer spezifischen Referenzmethode gemessen. Im Plasma gesunder Erwachsener kann Cortisol mit der Proteinbindungsmethode spezifisch gemessen werden. Die in der ersten Mitteilung untersuchten fluorometrischen Verfahren werden der Proteinbindungsmethode gegenübergestellt.

### *A comparison of the specificity of simple methods for the measurement of plasma cortisol*

#### *2. The protein binding method*

The protein binding method of MURPHY was investigated. The influence on the sensitivity of the method of the adsorbent used for the separation of bound and free cortisol was systematically analyzed. The criteria for the reliability of the method are reported. Plasma samples from 50 blood donors were analyzed to test specificity and the same samples were analyzed by a specific reference method. In the plasma of healthy adults, the protein binding method is specific for the measurement of cortisol. The fluorometric methods studied in the first communication are compared with the protein binding method.

Das Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse zur Messung des Cortisol wurde 1963 von MURPHY (1) eingeführt. In der Folgezeit wurden eine Reihe methodischer Verbesserungen vorgeschlagen (2—6). Eine große Zahl dieser Modifikationen bezieht sich auf die Trennung des gebundenen vom freien Liganden. Heute werden zu dieser Trennung überwiegend feste Adsorbentien eingesetzt (7). Der Einfluß von Art und Menge des Adsorbens auf die Empfindlichkeit der Methode wurde von MURPHY (3) untersucht. Die hierfür verantwortlichen Eigenschaften des Adsorbens wurden bisher nicht ausreichend analysiert.

So fehlen hinreichende Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Adsorption, zur Ermittlung der Adsorptionskonstanten und zur Bindung von Protein an das Adsorbens. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge erlaubt die Optimierung der Methoden in bezug auf Empfindlichkeit und Präzision. Wir führten entsprechende Untersuchungen für Florisil durch.

Eine Reihe von natürlich vorkommenden Steroidhormonen weisen eine hohe Affinität zum Corticosteroid-bindenden Globulin (CBG) auf. Sie stören bei der Cortisolbestimmung wegen ihres vergleichsweise niederen Plasmaspiegels nur geringfügig. Eine Ausnahme stellen die Proben von Neugeborenen, Schwangeren sowie von Patienten mit adrenogenitalem Syndrom dar, bei denen eine chromatographische Abtrennung vor der Endpunktbestimmung unerlässlich ist (8). Das gleiche gilt für die Cortisolbestimmung bei

Metopironbelastung. MURPHY hat eine Reihe von normalen Plasmabestandteilen und von Medikamenten geprüft (3). Keine der untersuchten Substanzen führte zu einer Verdrängung des Cortisol vom Corticosteroid-bindenden Globulin.

Bei den Proteinbindungsmethoden ist neben der kompetitiven Verdrängung jedoch auch eine unspezifische Alterierung des bindenden Globulins, sei es durch Rückstände aus den verwandten Reagenzien, sei es durch Plasmabestandteile in Erwägung zu ziehen, die zur Verfälschung der Meßwerte führen kann.

So beobachteten LORAS und Mitarbeiter (5) das unregelmäßige Auftreten von „Leerwerten“, die das Meßergebnis in einigen Proben fälschlich zu hoch erscheinen ließen. Der Vergleich der Proteinbindungsmethode mit spezifischeren, chromatographische Trennschritte enthaltenden Methoden erbrachte keine einheitlichen Ergebnisse. So fanden BERTINS und Mitarbeiter (9) zwar in Proben mit niederem Cortisolgehalt keine, in solchen mit hohem Cortisolgehalt jedoch erhebliche Unterschiede. NUGENT und Mitarbeiter (2) beschreiben größere Differenzen, bei einigen Proben insgesamt jedoch eine gute Übereinstimmung. ITURZAETA und Mitarbeiter (8) maßen im Plasma endokrinologisch gesunder Personen gleich hohe Werte wie mit einer Doppelmarkierungsmethode. Wir analysierten mit der Proteinbindungsmethode 50 Plasmaproben gesunder Blutspender, deren Cortisolspiegel zwischen 8 und 240 µg/l betrug. Die Werte

wurden mit denen einer Referenzmethode genau überprüfter Spezifität verglichen.

## Methodik

### Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden p. a.-Reagenzien der Firma Merck verwandt.

1. Dichlormethan nachgereinigt (10).
2. Äthanol nachgereinigt (10).
3. Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (11) 66,7 mM pH 7,4 und 8,0.
4. Cortisol.
5. Cortisol-[1,2-<sup>3</sup>H], spez. Aktivität 57,9 Ci/mMol.
- Radiochemische Reinheit im System Chloroform: Methanol 92:8 97proz.<sup>1)</sup>
6. Florisil 60—100 mesh<sup>2)</sup> 5 g Florisil werden 5mal mit demin. Wasser gewaschen und anschließend bei 120° im Ofen getrocknet.
7. Testplasma für die Proteinbindungsmethode: Das Plasma einer östrogenbehandelten Person wird durch Behandlung mit Tierkohle steroidfrei gemacht (12) und in Portionen von 0,6 ml bei -30° eingefroren. Es wird vor Gebrauch mit Phosphatpuffer pH 8,0 1:100 verdünnt. Es werden 4 ng/ml nichtmarkiertes und 32 nCi/ml tritiiertes Cortisol zugegeben. Die Lösung wird vor Gebrauch frisch angesetzt.
8. Szintillationsflüssigkeit: 7 g PPO und 100 g Naphtalin werden in 1 l Dioxan gelöst.

### Geräte

Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb Typ 3375<sup>3)</sup>.  
Rotationsmischer Typ 3300<sup>4)</sup>.

### Reinigung der Glasgefäße

Nach dem gewöhnlichen Spülgang und dem Trocknen werden alle Glasgefäße im Ofen<sup>5)</sup> eine Stunde auf 500° erhitzt (26).

### Arbeitsweise

Da die Originalvorschrift von MURPHY (3) in einigen Punkten geändert wurde, wird der Analysengang beschrieben: Zu 50 µl Plasma werden 250 µl Phosphatpuffer pH 7,4 gegeben. Es wird mit 2,5 ml Dichlormethan extrahiert. Nach dem Schütteln und Zentrifugieren werden 2 ml des Extraktes in die Reaktionsröhrchen gegeben und unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Dazu werden 1 ml des verdünnten Testplasmas gegeben. Die Proben werden 15 Min. im Wasserbad bei 45° und anschließend 30 Min. bei 6° im Kältelabor aufbewahrt, wo auch die weitere Aufarbeitung erfolgt. Dann werden 25 mg Florisil mit einem selbstgefertigten Glaslöffel zugegeben. Die Proben werden 10 Min. gerüttelt. 500 µl des Überstandes werden in Zählgefäße überführt und in 10 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen.

Zur Gewinnung der Standardkurve werden 2, 4, 8, 12 und 16 ng Cortisol zum verdünnten Testplasma gegeben. Die Aufarbeitung erfolgt parallel mit den Proben. Die Standardkurve wurde entsprechend dem Vorschlag von ROBBARD und Mitarbeitern (13) aufgezeichnet, die den Vorteil bietet, daß die Werte von einer Geraden abgelesen werden können.

Dabei wird der Logit  $(L = \ln \frac{x}{100-x})$  von  $\frac{B}{B_0} \cdot 100$  gegen den Logarithmus der zugegebenen Cortisolmenge aufgetragen (Abb. 1). B ist die Radioaktivität im Überstand nach Zugabe einer definierten Menge Cortisol. Die Berechnung der Plasmakonzentration erfolgt unter Berücksichtigung des eingesetzten Plasmavolumens und der Aliquotierung des Extraktes nach der Formel:

$$\text{Cortisol } (\mu\text{g/l}) = \frac{a \cdot 2000}{80}; a \text{ ist die an der Standardkurve ermittelte Menge Cortisol in Nanogramm.}$$

<sup>1)</sup> Radiochem. Centre, Amersham.

<sup>2)</sup> Serva, Heidelberg.

<sup>3)</sup> Packard Instruments, Illinois, USA.

<sup>4)</sup> Eppendorfgerätee, Netheler und Hinz, Hamburg.

<sup>5)</sup> Typ EFU 60/60, Fa. Heraeus, Hanau.

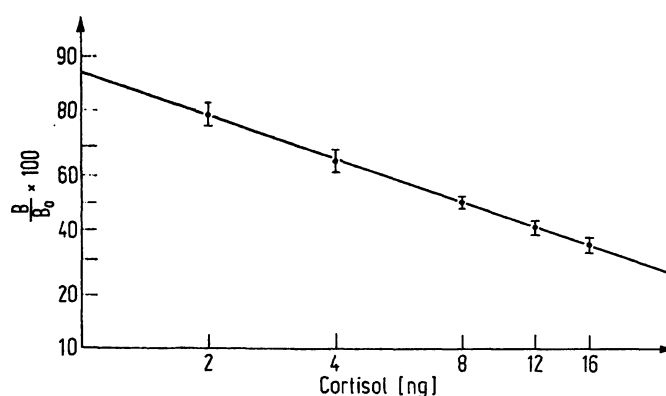


Abb. 1

Standardkurve. Die zugegebene Cortisolmenge (Abszisse) ist in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Auf der Ordinate ist der Logit  $(L = \ln \frac{x}{100-x})$  von  $\frac{B}{B_0} \cdot 100$  aufgetragen. Für B wird die Cortisolmenge im Überstand bei definierter Cortisolzugabe eingesetzt

## Ergebnisse und Diskussion

Versuche zur Trennung von gebundenem und freiem Cortisol mit Florisil

### Einfluß der Adsorbensmenge auf die Dissoziation des Cortisol vom CBG

Zu 1 ml 1:100 verdünntem Testplasma, das 5 ng Cortisol und 32 nCi Cortisol-[1,2-<sup>3</sup>H] enthielt, wurden 3,5; 6,4 und 40 mg Florisil gegeben. Nach einer Rüttelzeit von 2—90 Min. wurde die Radioaktivität in jeweils 500 µl des Überstandes bestimmt. Der Versuch fand bei 6° im Kältelabor statt. In Abbildung 2 ist die Zahl der Imp./Min. im Überstand gegen die Rüttelzeit aufgetragen (Kurve 1a, 2a und 3a).

Es wurde ein entsprechender Ansatz ohne CBG gemacht. Dabei wurde anstelle des verdünnten Testplasmas Phosphatpuffer eingesetzt. Die Abnahme der Radioaktivität im Überstand zeigen die Kurven 1b

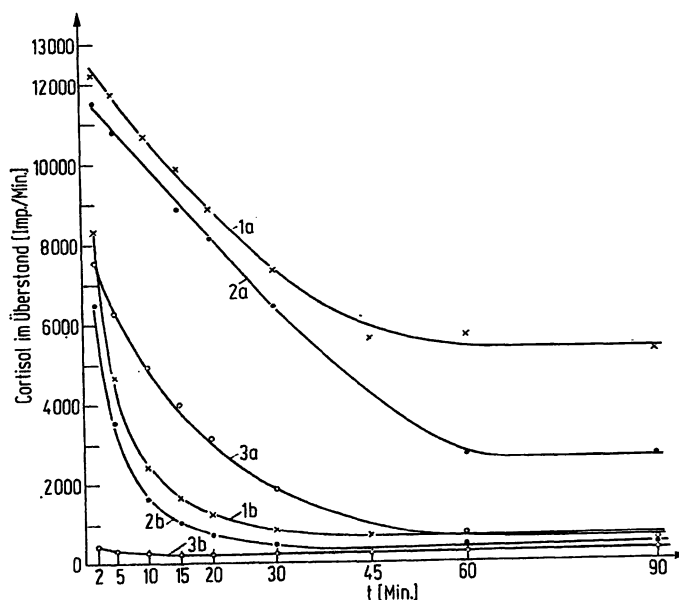


Abb. 2

Dissoziation des Cortisol vom CBG. Auf der Ordinate ist die Zahl der Imp./Min. im Überstand aufgetragen. Bei den mit a bezeichneten Kurven wurde 1:100 verdünntes Plasma, bei den mit b bezeichneten Phosphatpuffer eingesetzt. Kurve 1 3,5 mg, Kurve 2 6,4 mg und Kurve 4 40 mg Florisil

(3,5 mg), 2b (6,4 mg) und 3b (40 mg Florisil). Nach etwa 45 Min. hat die Verteilung des Cortisol zwischen Florisil und CBG das Gleichgewicht erreicht. Die Dissoziation vom CBG verläuft um so rascher, je mehr Florisil dem System zugegeben wird. Während bei 40 mg das Cortisol quantitativ vom CBG entfernt wird, ist das Gleichgewicht bei kleineren Adsorbensmengen mehr zu Gunsten des eiweißgebundenen Cortisol verschoben. Wie der Vergleich der Kurven 1a und 1b zeigt, findet eine Dissoziation vom CBG auch in Anwesenheit von nur kleinen Florisilmengen statt. LIPSEY und Mitarbeiter (14) beschrieben die Trennung des freien vom gebundenen Liganden im Gleichgewicht bei einer Methode zur Bestimmung von Progesteron. Dabei wurde einerseits ein hoher Prozentsatz ( $\sim 95$  Prozent) des freien Liganden an Florisil adsorbiert, andererseits wurde das Progesteron nicht vom CBG entfernt. Die Trennung des gebundenen vom freien Cortisol ohne Dissoziation wäre bei der Cortisolbestimmung nur mit Florisilmengen von weniger als 3,5 mg/ml möglich. So geringe Mengen sind jedoch nur schlecht reproduzierbar abzumessen. Zudem würde kein ausreichender Prozentsatz des freien Cortisol mehr adsorbiert.

#### *Einfluß der Rüttelzeit auf die Adsorption von Cortisol an Florisil und Ermittlung der Adsorptionskonstante*

Wir bestimmten die Adsorptionskonstante von Florisil für Cortisol nach dem Vorschlag von HEYNS und Mitarbeitern (12). Im Bereich geringer Belegung kann die FREUNDLICH-Isotherme näherungsweise als Gerade dargestellt werden:  $\frac{b}{M} = K \frac{f}{V}$ .

Dabei ist  $b$  die an Florisil gebundene,  $f$  die freie Menge Cortisol,  $M$  ist die Florisilmenge,  $V$  das Volumen und  $K$  die Adsorptionskonstante. Trägt man nun  $b/f$  gegen  $M$  auf, so ergibt sich die Adsorptionskonstante aus der Steigung. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches. Das Volumen betrug 1 ml, die Cortisolmenge war 8 ng und 32 nCi Cortisol-[1,2<sup>3</sup>H]. Es wurde bei 6° gearbeitet. Nach 60 Min. ist das Gleichgewicht erreicht. Die Adsorptionskonstante ist  $1,65 \cdot 10^3$  ml/g. Für 2 Min. Rüttelzeit ergibt sich eine um mehr als eine Zehnerpotenz geringere „Adsorptionskonstante“. (Hier mit Anführungszeichen versehen, da sie nicht im Gleichgewicht gewonnen wurde.) Die Adsorption von Cortisol ist also ein langsam ablaufender Prozeß. Diese Form der Darstellung (Abb. 3) gestattet die Ermittlung der Florisilmenge, die notwendig ist, um bei vorgegebener Rüttelzeit einen definierten Anteil des Cortisol zu adsorbieren. Um zum Beispiel unter den hier geschilderten Bedingungen 80 Prozent des Cortisol zu adsorbieren, müssen bei einer Rüttelzeit von 60 Min. 2,4 mg Florisil, bei einer Rüttelzeit von 15 Min. 8,4 mg und bei 2 Min. 40,4 mg Florisil eingesetzt werden.

#### *Adsorption von Eiweiß an Florisil*

Zu 1 ml 1:100 verdünntem Plasma wurden 5, 25, 50 und 80 mg Florisil gegeben. Nach einer Schüttelzeit

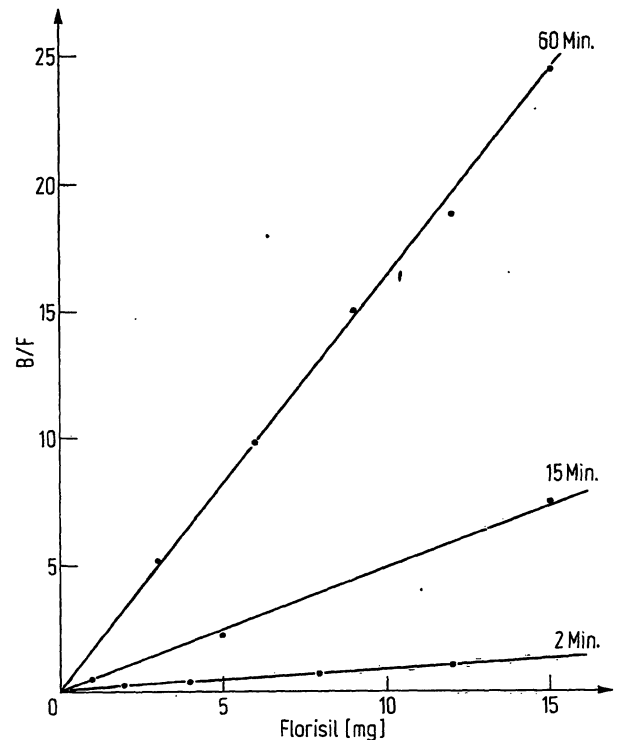


Abb. 3  
Ermittlung der Adsorptionskonstanten von Florisil für Cortisol.  $K$  nach 60 Min. (im Gleichgewicht)  $1,65 \cdot 10^3$  ml/g „ $K$ “ nach 15 Min.  $4,7 \cdot 10^2$  „ $K$ “ nach 2 Min.:  $9,5 \cdot 10^1$

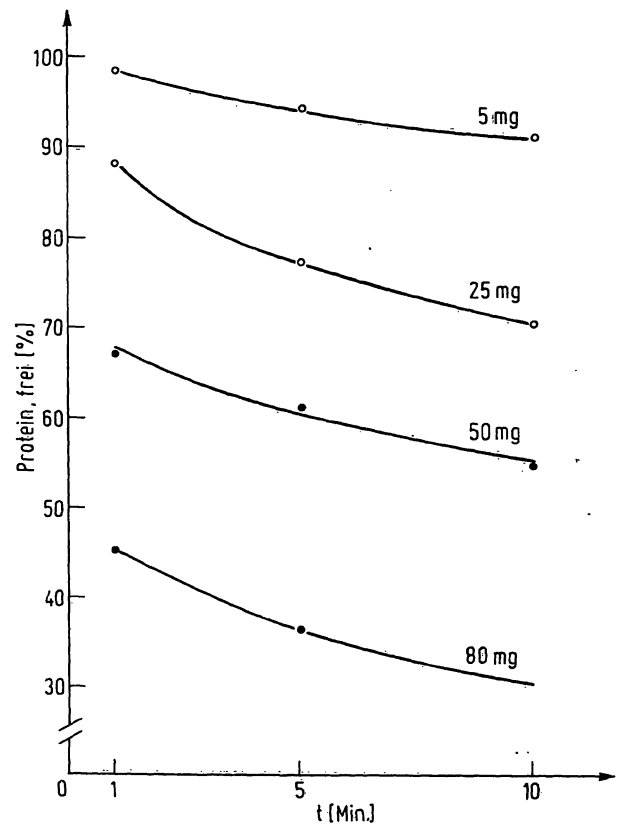


Abb. 4  
Adsorption von Protein an Florisil. Der Versuch wurde mit 1:100 verdünntem Plasma (Proteingehalt: 0,74 mg pro ml) bei 6° durchgeführt

von 1, 5 und 10 Min. wurde der Eiweißgehalt in 500  $\mu$ l des Überstandes mit der Biuretreaktion bestimmt (15). Der Ausgangswert betrug 740 mg/l. Als

Standard diente ein Humanserum für die Richtigkeitskontrolle<sup>6)</sup>. Abbildung 4 zeigt, daß die Eiweißadsorption sehr rasch eintritt. 80 mg Florisil binden auch nach nur 1 Min. Rüttelzeit über 50% des Proteins.

#### Beeinflussung der Adsorption von Cortisol durch Eiweiß

Der zeitliche Verlauf der Adsorption von Cortisol an Florisil wurde bei 6° untersucht. Zu 1 ml Phosphatpuffer pH 7,4 wurden 8 ng Cortisol, 32 nCi Cortisol-[1,2-<sup>3</sup>H] und 25 mg Florisil gegeben. Nach 2, 5, 10, 20 und 30 Min. wurde die Radioaktivität in 500 µl des Überstandes gemessen. In einem parallelen Ansatz wurde dem Puffer jeweils 0,7 mg/ml  $\gamma$ -Globulin (Rind)<sup>6)</sup> zugegeben. Wie Abbildung 5 zeigt, vermindert die Anwesenheit von  $\gamma$ -Globulin die Cortisoladsorption um so mehr, je kürzer die Rüttelzeit ist. Da eine spezifische Verunreinigung des Globulin-Präparates durch CBG praktisch auszuschließen ist, kann der Kurvenverlauf am ehesten durch eine direkte Beeinflussung der Cortisoladsorption erklärt werden. Neben dem CBG-Gehalt und der Verdünnung des Testplasmas sowie der im System vorhandenen Cortisolmenge ist vor allem Art und Menge des eingesetzten Adsorbens sowie die Rüttelzeit für die Steilheit der Standardkurve und damit für die Empfindlichkeit der Methode von Bedeutung. Dabei wird sich die jeweils wünschenswerte Empfindlichkeit der Standardkurve nach dem zur Verfügung stehenden Probevolumen und der zu erwartenden Cortisolkonzentration richten. Nachdem eine Trennung von gebundenem und freiem Cortisol im Gleichgewicht praktisch nicht zu erreichen ist, erscheint Florisil als das Adsorbens der Wahl. Zentrifugieren ist überflüssig und ein exaktes Einhalten der Adsorptionszeit möglich.

Aus den geschilderten Adsorptionsversuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

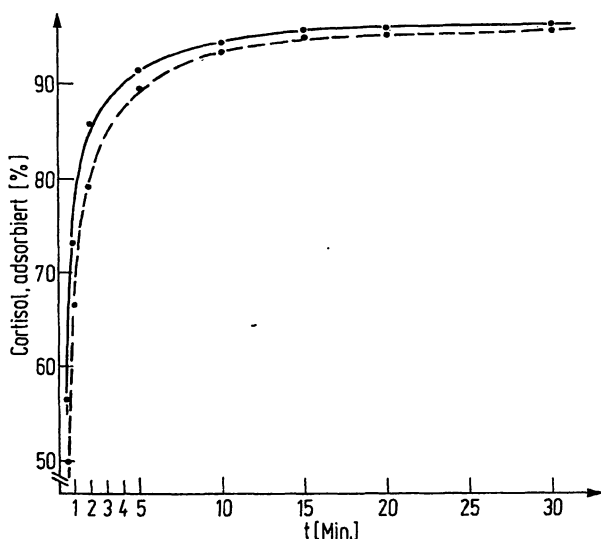


Abb. 5

Einfluß von Eiweiß auf die Cortisoladsorption. Obere Kurve Adsorption von 8 ng Cortisol an 25 mg Florisil bei 6°. Untere Kurve: Gleicher Versuch in Gegenwart von 0,7 mg/ml  $\gamma$ -Globulin

<sup>6)</sup> Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

1. Florisil wird trotz seiner günstigen Eigenschaften oft nicht benutzt, da seine Affinität zu Cortisol angeblich zu gering ist (3). Diese Schwierigkeit kann jedoch durch ausreichende Rüttelzeit umgangen werden.

2. Einige Autoren (5, 16, 17, 18) wählen bei der Trennung von gebundenem und freiem Cortisol mit Florisil sehr kurze Rüttelzeiten (1/2 bis 1 Min.). Das geschieht in der Absicht, die Dissoziation vom CBG möglichst klein zu halten. Die Standardkurve ist um so steiler, je weniger Cortisol dissoziiert. Andererseits wird die Standardkurve aber flacher, je geringer der Prozentsatz des freien Cortisol wird, der adsorbiert wird. Da die Adsorption aber langsam verläuft und zudem durch das anwesende Eiweiß noch verlangsamt wird, müssen große Mengen Florisil eingesetzt werden. Die zitierten Autoren benutzen 40 bis 80 mg. Nun werden aber auch nach sehr kurzer Rüttelzeit durch so große Florisilmengen erhebliche Anteile des Protein und damit auch des CBG adsorbiert. Das führt zu einer Abflachung der Standardkurven. Der an sich günstige Effekt kurzer Rüttelzeiten wird aufgehoben. Abbildung 6 zeigt das an einem Beispiel. Es wurden zwei Standardkurven in der oben beschriebenen Weise aufgenommen. Die obere Kurve wurde mit 25 mg Florisil und 10 Min. Rüttelzeit, die untere mit 80 mg Florisil und 1 Min. Rüttelzeit erzielt.

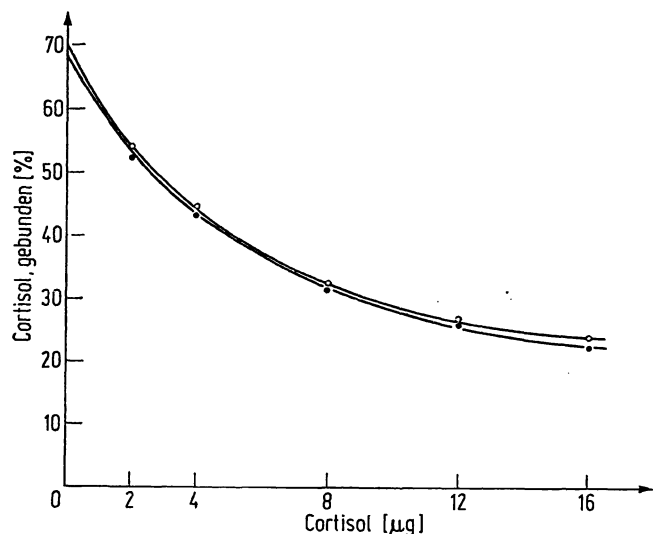


Abb. 6

Standardkurven bei verschiedener Rüttelzeit. Obere Kurve: 25 mg Florisil, 10 Min. Rüttelzeit, Untere Kurve: 80 mg Florisil, 1 Min. Rüttelzeit

#### Zuverlässigkeitskriterien der Proteinbindungsmethode

##### Präzision

Die Reproduzierbarkeit der Standardkurve wurde geprüft. Dazu wurden für jeden Punkt der Kurve 10fach-Bestimmungen durchgeführt. Die 95proz. Vertrauensbereiche für die Einzelmessung wurden ermittelt und sind in Abbildung 1 eingezeichnet.

Die Präzision der Gesamtanalyse wurde aus der Qualitätskontrolle ermittelt. Es wurden dabei ein Plasmapool

Tab. 1  
Präzision der Proteinbindungsmethode

		Streuung in der Serie		Streuung von Tag zu Tag	
$\bar{x}$	$s$	79	170	79	170
VK	$\mu\text{g/l}$	7,0	10,2	7,3	11,7
Anzahl der Bestimmungen	%	9,1	6,0	9,2	7,1
	n	14	14	14	14

mit niederem und einer mit hohem Cortisolgehalt analysiert. Das Ergebnis zeigt Tabelle 1.

#### Wiederauffindungsrate

Zu 50  $\mu\text{l}$  Plasma werden 32 nCi Cortisol-[1,2<sup>3</sup>H] gegeben. Die Proben werden in der beschriebenen Weise mit Puffer pH 7,4 verdünnt und mit Dichlormethan extrahiert. Wie bereits geschildert, werden 80% des Extraktes zur Endpunktbestimmung eingesetzt. Es ergibt sich eine Wiederauffindungsrate von 76,12  $\pm$  1,85%.

Zu einem Plasmapool mit 79  $\mu\text{g/l}$  und zu einem zweiten mit 170  $\mu\text{g/l}$  werden jeweils 100  $\mu\text{g/l}$  Cortisol aufgestockt. Es wurden 102,1  $\pm$  12,7% ( $\bar{x} \pm s$ , n = 16) bzw. 99,8  $\pm$  10,8% (n = 16) wiedergefunden.

#### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde nach dem Vorschlag von KAISER (19) ermittelt. Der dreifache Wert der Standardabweichung der Leerwerte (n = 12) entspricht einer Nachweisgrenze von 0,64 ng pro Ansatz. Bei dem hier eingesetzten Plasmavolumen entspricht das 12,8  $\mu\text{g/l}$ .

#### Leerwerte

Es wurde untersucht, ob die im Analysengang benutzten Reagenzien zu einer Entfernung des Cortisol vom CBG aufgrund unspezifischer Einwirkung führen. Anstelle von Plasma wurden 50  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer pH 7,4 durch den Analysengang geführt. Nach der Trennung von gebundenem und freiem Liganden fanden sich 66,94  $\pm$  1,50% der eingesetzten Radioaktivität im Überstand. Am Ausgangspunkt der Standardkurve ( $B_0$ ) — ohne Zugabe von nichtmarkiertem Cortisol — fanden sich 66,75  $\pm$  1,26% im Überstand. Eine unspezifische Verdrängung findet also nicht statt. Das dürfte auf die kleinen Volumina der eingesetzten Reagenzien zurückzuführen sein.

#### Spezifität

Mit der hier untersuchten Proteinbindungsmethode wurden die Plasmaproben von 50 gesunden Blutspendern analysiert. Die gleichen Proben wurden

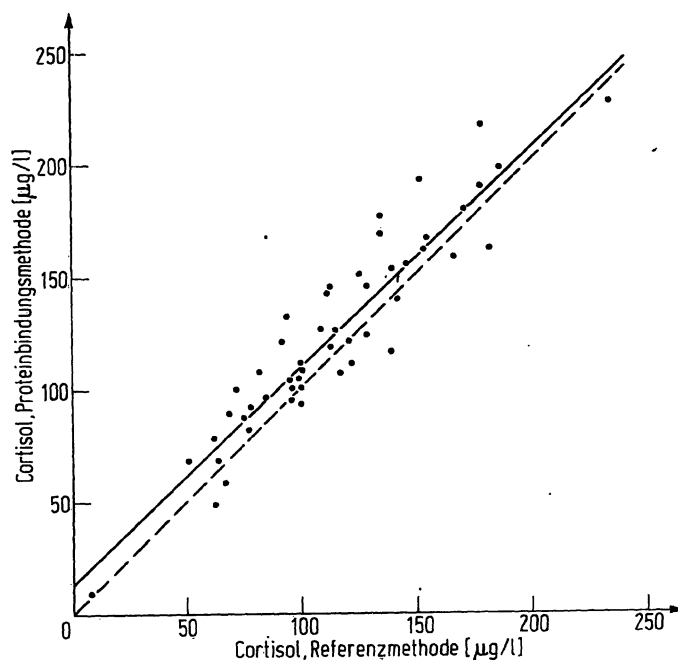


Abb. 7  
Die Werte der Proteinbindungsmethode wurden gegen die der Referenzmethode aufgetragen. — Regressionsgerade, ---- Idealgerade  $x_{(i)} = x_{(r)}$

bereits mit verschiedenen fluorometrischen Verfahren und der früher dargestellten (10) Referenzmethode untersucht. In Abbildung 7 sind die Meßwerte gegen die der Referenzmethode aufgetragen. Zur besseren Orientierung wurde neben der Regressionsgeraden die „ideale“ Regressionsgerade mit dem Ordinatenabschnitt null und der Steigung 1 aufgetragen.

Die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte in der gleichen Weise wie bereits in der ersten Mitteilung (10) nach dem Vorschlag von HANSERT (20). Der Ähnlichkeitskoeffizient  $\tilde{S}$  wurde aus der Differenz der Meßwerte mit der Referenzmethode errechnet. Der Ähnlichkeitskoeffizient  $\tilde{S}$  setzt sich aus der Methodenstreuung  $S_2$  und  $L_1 + S_1$  in folgender Weise zusammen:

$$\tilde{S} = \sqrt{L_1 + S_1 + S_2}$$

Dabei sind  $L_1$  und  $S_1$  Ausdruck der unterschiedlichen Spezifität der verglichenen Methoden. Die Spezifität wird als ausreichend angesehen, wenn  $\sum L_1, S_1 < S_2$ . Das Ergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Meßwerte der Proteinbindungsmethode zeigen eine gute Übereinstimmung mit denen der Referenzmethode. Der Mittelwert aller 50 Proben war mit 125  $\mu\text{g/l}$  nur um 8,7% höher als der der Referenzmethode. Der auf mangelnde Spezifität zurückgehende Anteil am Ähnlichkeitskoeffizienten  $L_1 + S_1$  ist wesent-

Tab. 2  
Statistische Kenngrößen der Spezifität. Erläuterungen im Text

Methode	Mittelwert aus den 50 Proben $\bar{x}$ [ $\mu\text{g/l}$ ]	Ähnlichkeitskoeffizient $\tilde{S}$	Anteil der „Unspezifität“ $L_1 + S_1$	Anteil der Methodenstreuung $S_2$	Korrelationskoeffizient $r$	Regressionsgerade $y = a + bx$
1. Referenzmethode	115	1,31	0,31	1,41	0,935	$y = 13,6 + 0,97x$
2. Proteinbindungsmethode	125					

lich geringer als der Anteil der methodischen Streuung  $S_2$ . Die verbleibende Differenz der Mittelwerte von  $10 \mu\text{g/l}$  ist zu einem Teil auf den Corticosterongehalt der Proben zurückzuführen. Nimmt man ein Verhältnis Cortisol:Corticosteron wie 20:1 an (24), so bleibt noch eine Restdifferenz. Ob diese Restdifferenz Ausdruck einer unspezifischen Verdrängung vom CBG ist oder ob sie durch geringfügige systematische Fehler der Referenzmethode oder der Proteinbindungsmethode erklärt werden kann, muß offenbleiben.

Wir konnten damit an einer größeren Zahl von Proben die Beobachtung von NUGENT und MAYES (2), BOWMAN und Mitarbeitern (4) und von ITURZAETA und Mitarbeitern (8) bestätigen, daß die Proteinbindungsmethode ohne chromatographische Trennung im Plasma gesunder Erwachsener spezifische Meßwerte liefert.

### Folgerungen

Betrachtet man alle hier und in der ersten Mitteilung untersuchten Methoden, so wiesen neben der Proteinbindungsmethode die fluorometrischen Verfahren von CLARK und RUBIN (21), GRAEF und STAUDINGER (22) und von MARTIN und MARTIN (23) gute Spezifität auf. Die beiden erstgenannten fluorometrischen Verfahren und die Proteinbindungsmethode sind etwa gleich

zeitaufwendig und weisen nach unseren Erfahrungen bei entsprechender Handhabung nur geringe Störanfälligkeit auf. Auch die Präzisionen sind etwa gleich gut. Stehen nur geringe Probevolumina zur Verfügung, so ist die Proteinbindungsmethode wegen ihrer hohen Empfindlichkeit überlegen. Kann jedoch eine ausreichende Plasmamenge (1 ml) eingesetzt werden, so wird die Entscheidung zwischen den genannten fluorometrischen Verfahren und der Proteinbindungsmethode am ehesten eine Frage der zur Verfügung stehenden Geräte und Einrichtungen sein.

Eine Einschränkung muß allerdings gemacht werden. Da die Fluoreszenz in konzentrierter Schwefelsäure eine sehr unspezifische Reaktion ist, kann es zu Interferenz von Medikamenten kommen (25). Es wird also zu prüfen sein, ob die betreffenden Substanzen bei den Reinigungsschritten der fluorometrischen Verfahren entfernt werden. Bei der Proteinbindungsmethode dagegen wurden bisher keine Störungen durch Medikamente, soweit es sich nicht um Steroide handelt, beschrieben.

Fräulein DAGMAR SIEMEISTER und Fräulein SUSANNE HAUPT sei an dieser Stelle für ihre sorgfältige Mitarbeit herzlich gedankt. Herrn Dr. E. HANSERT, Leiter der Biometrischen Abteilung des MPI für Psychiatrie danken wir für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.

### Literatur

- MURPHY, B. E. P., W. ENGELBERG und CH. J. PATTEE, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 23, 293 (1963).
- NUGENT, C. A. und D. M. MAYES, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 26, 1116 (1966).
- MURPHY, B. E. P., *J. Clin. Endocr.*, Springfield 27, 973 (1967).
- BOWMAN, R. E. und R. F. DE LUNA, *Analyt. Biochem.* 26, 465 (1968).
- LORAS, B., H. ROUX und M. H. PHILIPPE, *Ann. endocr. (Paris)* 383 (1970).
- KOLANOWSKI, J. und M. A. PIZARRO, *Ann. endocr. (Paris)* 177 (1969).
- SLAUNWHITE, W. E. und A. A. SANDBERG, *Acta endocr., K'hvn. Suppl.* 147, 144 (1970).
- ITURZAETA, N. F., D. A. HILLMAN und E. COLLE, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 30, 185 (1970).
- BEITINS, J. Z., M. H. SHAW, A. KOWARSKY und C. J. MIGEON, *Steroids* 15, 765 (1970).
- PIRKE, K. M. und D. STAMM, *diese Z.* 10, 243 (1972).
- SÖRENSEN, S. P. L., *Biochem. Z.* 22, 352 (1909).
- HEYNS, W., H. VAN BAELEN und P. DE MOOR, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 18, 361 (1967).
- RODBARD, D., W. BRIDSON und P. L. RAYFORD, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 74, 770 (1969).
- LIPSETT, M. B., P. DOERR und J. A. BERMUDEZ, *Acta endocr., K'hvn. Suppl.* 147, 155 (1970).
- REINBOLD, J. G., in *Standard Methods of Clin. Chem.* Vol. 1, 88 Academic Press, New York (1953).
- KATO, T., M. KOSHIMA, Z. TSAI, N. SHIMIZU, Y. ARAKI und Y. YOSHITOSHI, *Endocr. jap.* 17, 37 (1970).
- Hsu, T. H. und T. BLEDSOE, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 30, 443 (1970).
- BLUNCK, W., *diese Z.* 9, 287 (1971).
- KAISER, H., *Z. analyt. Chem.* 209, 1 (1965).
- HANSERT, E., in Vorbereitung.
- CLARK, B. R. und R. T. RUBIN, *Analyt. Biochem.* 29, 31 (1969).
- GRAEF, V. und H. J. STAUDINGER, *diese Z.* 8, 368 (1970).
- MARTIN, M. M. und A. L. A. MARTIN, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 28, 137 (1968).
- BRORSON, I., *Acta endocr., K'hvn.* 58, 445 (1968).
- DIXON, P. F., M. BOOTH und J. BUTLER, in *Hormones in Blood* sec. Edition Academic Press, New York (1967).
- KNORR, D., *diese Z.* 9, 175 (1971).

Dr. K. M. Pirke  
8000 München 23  
Kraepelinstr. 10